

УДК 547.633.6

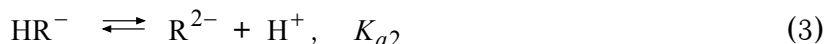
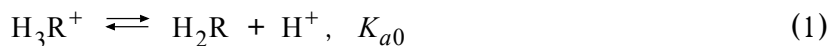
## ИОНИЗАЦИЯ И ТАУТОМЕРИЯ ТИОФЛУОРЕСЦЕИНА В ВОДНОМ РАСТВОРЕ

© 2000 Н.О.Мчедлов-Петросян, Н.А.Водолазкая, Д.В.Самойлов\*

Значения  $pK_a$  и характер таутомерии Тиофлуоресцеина в водном растворе показывают, что замена гетероатома кислорода в молекуле Флуоресцеина на атом серы мало сказывается на протолитических свойствах.

Продолжив систематическое исследование гидроксиксантеновых красителей [1–4], мы изучили протолитические равновесия Тиофлуоресцеина в водном растворе. В отличие от Флуоресцеина это соединение, насколько нам известно, в данном аспекте совершенно не исследовано, несмотря на его ценные оптические свойства [5,6]. Кроме того, интересно было выяснить, насколько замена гетероатома кислорода на серу повлияет на значения констант диссоциации и на характер таутомерии. Нами использован препарат Тиофлуоресцеина, синтезированный В.П.Мартыновой в лаборатории профессора А.В.Ельцова [5,6]. Чистота и индивидуальность препарата доказаны упомянутыми исследователями при помощи методов элементного анализа и ТСХ. Спектр ЯМР  $^1H$  (ДМСО- $d_6$ ) измерен на приборе Bruker AM-500 (500 МГц);  $\delta$ , м. д.: 6.62 д (2H, 2,7-H,  $J_{AB}$  8.6 Гц), 7.73 д (2H, 1,8-H  $J_{AB}$  8.6 Гц), 6.94 с (2H, 4,5-H), 7.50-7.97 м (4H,  $C_6H_4COO$ ). Систематическое название соединения в виде нейтрального лактона: 3',6'-дигидроксиспиро[изобензофуран-1(3H), 9'(9H)-тиоксантен]-3-он, а в виде нейтрального хиноида: 2-(6-гидрокси-3-оксо-3H-9-тиоксантенил)бензойная кислота.

Предварительные спектрофотометрические исследования показали, что ионизация в водном растворе происходит, как и в случае Флуоресцеина, в три ступени:



Для определения констант ионизации (в рассматриваемом случае приравненных к константам диссоциации) использовался спектрофотометрический метод. Спектры измеряли на приборе СФ-46, в 1- и 5-сантиметровых кюветах. Для варьирования значений pH применяли фосфатные и ацетатные буферные растворы, а также разбавленные растворы HCl и NaOH. При этом ионная сила рабочих растворов поддерживалась постоянной и равной 0.05 моль/л добавками NaCl. Для измерения спектров поглощения катионной формы красителя  $H_3R^+$  применяли растворы  $H_2SO_4$  (2 и 3 моль/л). Значения pH определяли при 25 °С с помощью стеклянного электрода в цепи с переносом, градуированной по стандартным буферным растворам.

При исследовании равновесий в водном растворе рабочая концентрация красителя была  $2.2 \cdot 10^{-5}$  моль/л. Для расчетов значений  $pK_a$  использовались значения оптической плотности на 18 длинах волн ( $\lambda = 460-540$  нм), измеренные при 25 °С для 19 растворов с различными значениями pH. Спектр дианиона  $R^{2-}$  измерен при pH 12. Расчет значений  $pK_{a1}$  и  $pK_{a2}$  проведен на основании измерений в области pH 3.2–6.9 совокупно с коэф-

\* Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет), Санкт-Петербург.

фициентами молярного поглощения ( $\epsilon$ ) моноаниона  $\text{HR}^-$  [3,4] с использованием, как и ранее [2], программы CLINP. Значение  $pK_{a0}$  определено изолированно, из измерений в области pH 1.5–2.2. Значения показателей констант ионизации равны:  $pK_{a0}=2.07\pm 0.04$ ;  $pK_{a1}=4.63\pm 0.01$ ;  $pK_{a2}=6.34\pm 0.01$ . Спектр  $\text{H}_2\text{R}$  окончательно уточнялся из измерений в области pH максимального выхода молекулярной формы, с использованием этих значений  $pK_a$ . Спектры ионных и молекулярной форм в воде представлены на рис.1.

Для оценки термодинамических значений  $pK_a$  (Табл.1) коэффициенты активности ионов рассчитывали по второму приближению уравнения Дебая–Хюккеля, значение ионного параметра принято равным 5; коэффициент активности нейтральной формы ( $\text{H}_2\text{R}$ ) положен равным единице.

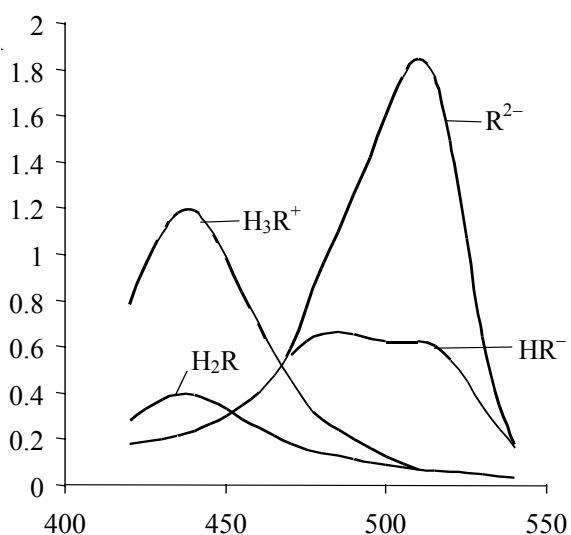


Рис.1. Спектры поглощения молекулярной и ионных форм Тиофлуоресцеина в водном растворе, приведенные к одной концентрации и длине кюветы.

Аналогичное исследование было проведено при малом содержании этилового спирта (массовая доля 3 %). В этом случае рабочая концентрация Тиофлуоресцеина была  $2.0 \cdot 10^{-5}$  моль/л, число рабочих растворов составляло 18, значения  $pK_{a1}$  и  $pK_{a2}$  находили из измерений в области pH 4.1–7.2, а  $pK_{a0}$  – при pH 1.6–2.6. Градуировка цепи с переносом проводилась и в этом случае по водным стандартам; судя по имеющимся данным, при столь

малом содержании спирта суммарная поправка на жидкостный потенциал и эффект среды для протона пренебрежимо мала [7]. При 25 °C и ионной силе 0.05 моль/л найдено:  $pK_{a0}=2.05\pm 0.05$ ;  $pK_{a1}=4.83\pm 0.02$ ;  $pK_{a2}=6.38\pm 0.01$ . Термодинамические значения представлены в Таблице 1.

**Таблица 1.** Значения параметров протолитического равновесия Флуоресцеина и Тиофлуоресцеина в водном растворе (25 °C)

Константа	Флуоресцеин [1]	Тиофлуоресцеин	Тиофлуоресцеин, 3 % этанола
$pK_{a0}$	2.14	1.99	1.96
$pK_{a1}$	4.45	4.71	4.92
$pK_{a2}$	6.80	6.59	6.64
$K_T$	6.04	8.4	5.0
$K_T^I$	1.96	3.8	0.55
$K_T^{II}$	3.08	2.2	9.1
$pK_{0,OH}$	3.10	3.11	2.78
$pK_{\pm,COOH}$	2.80	2.53	3.04
$pK_{IZ}$	3.79	4.17	3.84
$pK_{1,COOH}$	3.49	3.58	4.10

Значения  $\lambda_{\text{макс}}$ , нм ( $\epsilon_{\text{макс}} \cdot 10^{-3}$ , л моль $^{-1}$  см $^{-1}$ ) Тиофлуоресцеина в водном растворе равны:  $R^{2-}$ : 511 (16.7),  $HR^{-}$ : 485 (6.0), 505 пл.(5.6),  $H_2R$ : 438 (3.5),  $H_3R^{+}$ : 438 (10.8), а в 3%-ном водном этаноле  $R^{2-}$ : 511 (17),  $HR^{-}$ : 485 (5.8), 505 пл.(5.3),  $H_2R$ : 438 (2.1),  $H_3R^{+}$ : 438 (10.7).

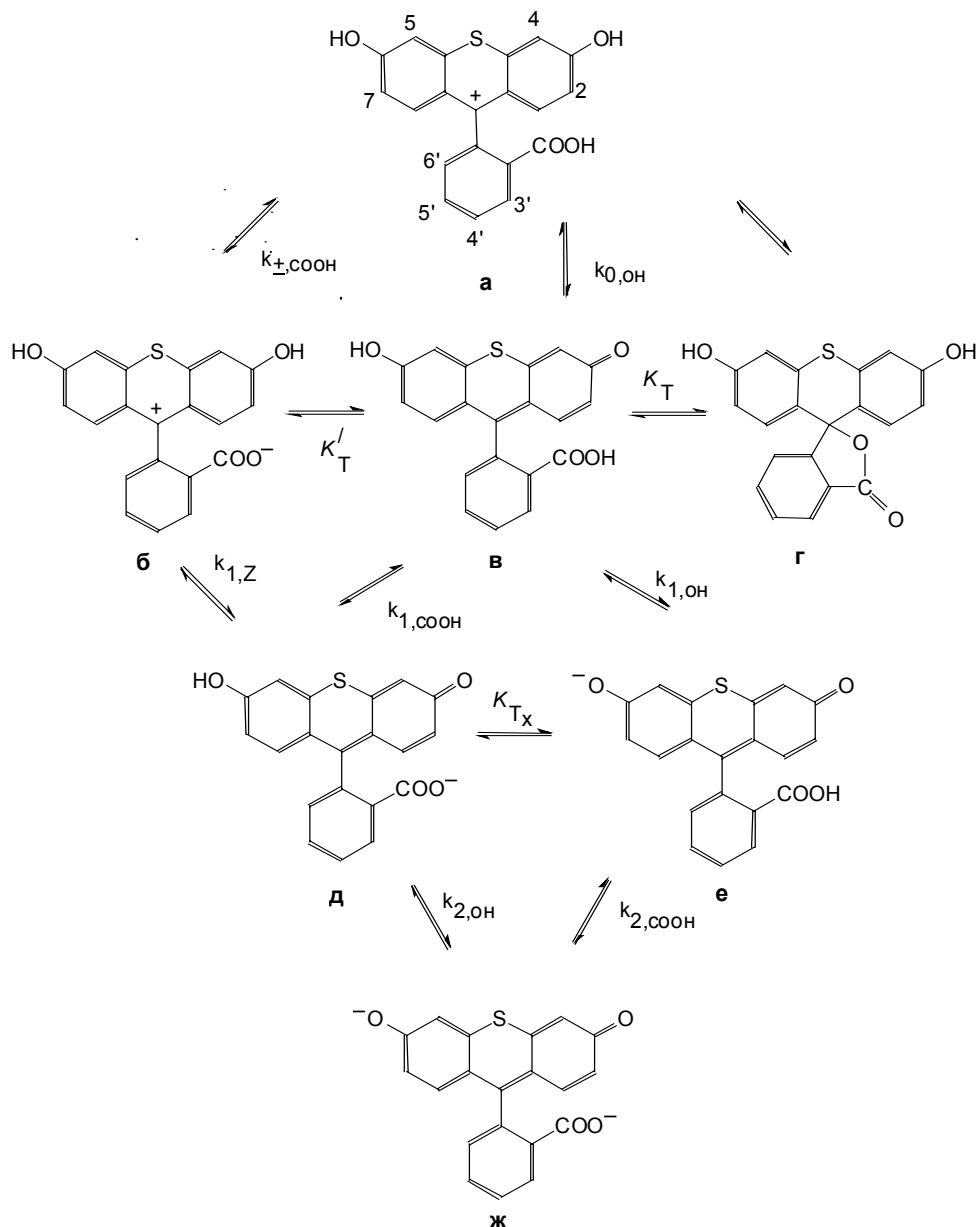


Схема 1. Протолитические равновесия Тиофлуоресцеина.

$$K_T = [г]/[в]; K'_T = [б]/[в]; K''_T = K_T / K'_T = [г]/[б]; K_{Tx} = [е]/[д]; k_{\pm, \text{COOH}} = a_H a_б / a_a; \\ k_{0, \text{OH}} = a_H a_в / a_a; k_{1, Z} = a_H a_д / a_б; k_{1, \text{COOH}} = a_H a_д / a_в; k_{2, \text{OH}} = a_H a_ж / a_д.$$

При рассмотрении первых строк Таблицы 1 бросается в глаза довольно сильное сходство значений  $pK_a$  Тиофлуоресцеина и Флуоресцеина, а анализ спектров поглощения (рис.1) приводит к заключению, что и характер таутомерии этих двух красителей весьма сходен. Главное же различие заключается в том, что значения  $\epsilon_{\text{макс}}$  катиона и дианиона серосодержащего красителя существенно, примерно в 5 раз, ниже соответствующих зна-

чений для его кислородного аналога. Поскольку соединения данного типа могут существовать в виде бесцветных лактонов и карбинолов, можно было бы предположить такие структуры и для ионов, по крайней мере — для анионов. Для флуоресцеиновых красителей, в отличие от фталеиновых, лактонные структуры считались нехарактерными, однако недавно [4] нами было показано, что в случае некоторых нитропроизводных Флуоресцеина анионы-лактоны в растворах бесспорно существуют и иногда даже преобладают. С другой стороны, именно в этих случаях варьирование состава растворителя (переход от воды к водно-органическим и неводным растворам, а также к мицеллярным растворам коллоидных поверхностно-активных веществ) приводит к заметным смещениям положения таутомерного равновесия анионов  $HR^-$  и  $R^{2-}$  [4]. В случае же Тиофлуоресцеина этого мы не наблюдали, и переход от воды к неводным средам приводит к заметному гипохромному эффекту лишь для нейтральной формы  $H_2R$ , для которой возможность существования бесцветной лактонной структуры бесспорна. Результаты исследования протолитических равновесий Тиофлуоресцеина и серии его бром- и нитропроизводных в смешанных растворителях с большим содержанием неводного компонента составят предмет отдельной публикации [8], в которой также будут высказаны возможные предположения относительно причин низкой интенсивности поглощения ионных форм Тиофлуоресцеина. В настоящем же сообщении мы будем рассматривать схему превращений этого красителя, аналогичную обоснованной ранее для Флуоресцеина и его галогенпроизводных [1–3].

Предполагая существование катиона в растворе в виде структуры **а**, нейтральной формы — в виде равновесной смеси цвиттер-иона **б**, хиноида **в** и бесцветного лактона **г**, моноаниона — в виде смеси двух таутомеров (**д** и **е**) и дианиона — в виде структуры **ж**, и принимая, что диссоциация карбоксильной группы ( $COOH \rightarrow COO^-$ ) незначительно сказывается на длинноволновой полосе поглощения, можно заключить, что моноанион существует почти исключительно в виде структуры **д**, а доли таутомеров нейтральной формы соизмеримы, хотя лактон при этом и преобладает.

Согласно представлениям, уже оправдавшимся ранее для флуоресцеиновых красителей [1–3], можно при фиксированной длине волны приравнять значения  $\epsilon$  таутомеров **б** и **в** значениям  $\epsilon$  форм  $H_3R^+$  (структура **а**) и  $HR^-$  (структура **д**). Протонирование или этерификация карбоксилатной группировки приводит к отчетливому батохромному сдвигу на несколько нанометров лишь в случае сравнительно узких полос поглощения красителей рассматриваемого типа, таких, например, как полоса дианиона  $R^{2-}$ . Это имеет место, в частности, в случае Эозина и других 2,4,5,7-тетрагалогенпроизводных Флуоресцеина [1–3], а также для Тиозозина и Тиоэритрозина [8]. В случае же Тиофлуоресцеина никаких признаков красного смещения по мере перехода от  $R^{2-}$  к  $HR^-$  не наблюдается (рис.1), и с таутомером **е** в случае моноаниона  $HR^-$  можно не считаться.

На основании изложенного расчет долей таутомеров ( $\alpha$ ) формы  $H_2R$  проводится по уравнению (4)

$$\epsilon(H_2R) = \alpha(\text{б}) \epsilon(H_3R^+) + \alpha(\text{в}) \epsilon(HR^-), \quad (4)$$

превращающегося в систему уравнений при использовании спектральных данных, полученных на различных длинах волн. При этом  $\alpha(\text{г}) = 1 - \alpha(\text{б}) - \alpha(\text{в})$ . Для водного раствора  $\alpha(\text{б}) = 0.288$ ,  $\alpha(\text{в}) = 0.076$ ,  $\alpha(\text{г}) = 0.636$ . В 3%-ном водном этаноле:  $\alpha(\text{б}) = 0.084$ ,  $\alpha(\text{в}) = 0.153$ ,  $\alpha(\text{г}) = 0.763$ . Отсюда легко рассчитать значения обозначенных на схеме

констант таутомерного равновесия и микроконстант ионизации ( $k$ ). Связь этих параметров с константами  $K_a$  выражается соотношениями:

$$pK_{a0} = pk_{0,OH} - \lg(1 + K_T + K'_T) = pk_{\pm,COOH} - \lg(1 + K''_T + (K'_T)^{-1}), \quad (5)$$

$$pK_{a1} = pk_{1,COOH} + \lg(1 + K_T + K'_T) = pk_{1Z} + \lg(1 + K''_T + (K'_T)^{-1}), \quad (6)$$

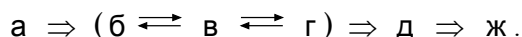
$$pK_{a2} = pk_{2,OH}. \quad (7)$$

При этом найденные из спектральных данных значения констант таутомерных равновесий рассматриваем как термодинамические, полагая концентрационные коэффициенты активности таутомеров в условиях оценки  $\varepsilon(H_2R)$  одинаковыми; через  $a_i$  на схеме обозначены активности. Результаты этих расчетов сопоставлены в Таблице 1 со значениями соответствующих параметров, найденных ранее [1] для Флуоресцеина. При этом впечатление о сходстве Тиофлуоресцеина и Флуоресцеина еще более усиливается. С другой стороны, сравнение значений  $pk_{0,OH}$  и  $pk_{1Z}$ , а также  $pk_{\pm,COOH}$  и  $pk_{1,COOH}$  показывает степень влияния дополнительного заряда на отщепление протона в исследуемых структурах. Эффекты в целом согласуются с представлениями Бьеррума – Кирквуда – Вестхаймера; более подробный анализ подобного влияния можно найти в специальной литературе [9].

Правомерность вывода о пренебрежимо малой доле моноаниона  $HR^-$ , существующей в виде таутомера **e**, подтверждается следующим образом. Из детальной схемы равновесий вытекает соотношение:

$$\lg K_{T_x} = pk_{1,COOH} - pk_{1,OH} = pk_{2,COOH} - pk_{2,OH}. \quad (8)$$

Принимая  $pk_{1,COOH}$  равным 3.58 и исходя из того, что значение  $pk_{1,OH}$  примерно на одну единицу ниже значения  $pk_{2,OH}$  (это вытекает из сравнения значений  $pk_{0,OH}$  и  $pk_{1Z}$ ,  $pk_{\pm,COOH}$  и  $pk_{1,COOH}$ , соответственно), получаем оценку:  $K_{T_x} \approx 0.01$ . К аналогичным выводам можно прийти, исходя из значения  $pk_{2,OH} = 6.59$  и полагая, что значение  $pk_{2,COOH}$  примерно на единицу выше, чем  $pk_{1,COOH}$ . Эти оценки не вполне независимы, но они подтверждают самосогласованность предложенной схемы протолитических превращений Тиофлуоресцеина, которую можно выразить следующим образом:



Интересно, что уже малая добавка спирта приводит к заметной дестабилизации цвиттер-иона **b** (Табл.1). Этот факт находится в согласии со снижением значения  $pk_{1Z}$  и повышением значения  $pk_{\pm,COOH}$ , поскольку цвиттер-ион Тиофлуоресцеина можно, как и в случае Флуоресцеина [1–3], рассматривать в первом приближении как два отдельных заряда. Соответственно и так называемые типы заряда [7] в этих двух случаях будут не 0/– и +/0 (в таком можно было бы ожидать некоторого роста первого значения и снижения второго, как это и наблюдается для  $pk_{1,COOH}$  и  $pk_{0,OH}$ ), а  $\pm/-$  и  $+/\pm$ . Незначительное влияние 3% этанола на значение  $pk_{2,OH}$  ( $= pK_{a2}$ ) Тиофлуоресцеина находится в соответствии с известным фактом малого влияния первых добавок органического растворителя на  $pK_a$  фенолов [7]. В случае Флуоресцеина влияние малых добавок органических растворителей носит сходный характер [10].

В целом, исходя из значений  $pK_a$  и характера таутомерии Тиофлуоресцеина можно заключить, что замена гетероатома кислорода в молекуле Флуоресцеина на атом серы мало сказывается на протолитических свойствах в водном растворе.

### Литература

1. Мchedlov-Петросян Н.О. Журн. аналит. химии. 1979. Т.34. №6. С.1055-1059.
2. Mchedlov-Petrosyan N.O., Salinas Mayorga R. J.Chem.Soc., Faraday Transactions. 1992. V.88. №20. P.3025-3032.
3. Mchedlov-Petrosyan N.O., Tychina O.N., Berezhnaya T.A., Alekseeva V.I., Savvina L.P. Dyes and Pigments. 1999. V.43. P.33-46.
4. Самойлов Д.В., Мchedlov-Петросян Н.О., Мартынова В.П., Ельцов А.В. Журн. общ. химии. 2000. Т.70. Вып.8. С.1343-1357.
5. Eltcov A.V., Smirnova N.P., Ponyaev A.I., Martinova W.P., Schutz R., Hartmann H. J. Luminescence. 1990. V.47. №1. P.99-105.
6. Ельцов А.В., Поняев А.И., Мартынова В.П. Журн. общ. химии. 1992. Т.62. Вып.7. С.1626-1630.
7. Бейтс Р. Определение pH. Л.: Химия, 1972. 400 с.
8. Мchedlov-Петросян Н.О., Водолазкая Н.А., Мартынова В.П., Самойлов Д.В., Ельцов А.В. Журн. общ. химии (в печати).
9. Верещагин А.Н. Индуктивный эффект. М.: Наука, 1987. 326 с.
10. Мchedlov-Петросян Н.О. Дисс. ... докт. хим. наук, Харьков, 1992.

Поступила в редакцию 2 октября 2000 г.

Kharkov University Bulletin. 2000. №495. Chemical Series. Issue 6(29). N.O.Mchedlov-Petrosyan, N.A.Vodolazkaya, D.V.Samoylov. Ionization and tautomerism of Thiofluorescein in aqueous solutions.

The thermodynamic  $pK_a$  values of stepwise ionization of Thiofluorescein in aqueous solutions ( $H_3R^+ \rightleftharpoons H_2R \rightleftharpoons HR^- \rightleftharpoons R^{2-}$ ) have been obtained spectroscopically at 25 °C:  $pK_{a0}=1.99 \pm 0.04$ ;  $pK_{a1}=4.71 \pm 0.01$ ;  $pK_{a2}=6.59 \pm 0.01$ . Conclusions concerning tautomerism of the molecular species were deduced from the Vis absorption spectra; the fractions of tautomers as well as microscopic ionization constants have been evaluated. The comparison of the data with those reported earlier for Fluorescein shows that the change of the heteroatom (O  $\rightarrow$  S) displays a relatively small influence on the parameters of the protolytic equilibrium.